

REC'D 11 NOV 2004

WIPO

PCT

PCT/JP 2004/014285

22.09.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 9 月 2 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 3 6 7 7 1
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 3 6 7 7 1]

出 願 人
Applicant(s):

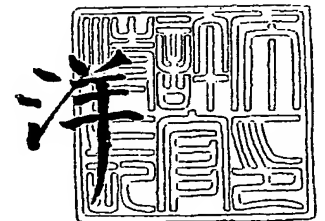
富山県
村口 篤
岸 裕幸
時光 善温
近藤 佐千子

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 0 月 2 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 9 7 8 1 9

【書類名】 特許願
【整理番号】 A35116H
【提出日】 平成15年 9月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県高岡市二上町 1 5 0 富山県工業技術センター内
 【氏名】 小幡 勤
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県高岡市二上町 1 5 0 富山県工業技術センター内
 【氏名】 横山 義之
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市明輪町 1 - 1 0 8 - 1 3 0 1
 【氏名】 村口 篤
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町 2 5 5 6 - 4 - 3 - 1 0 1
 【氏名】 岸 裕幸
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市萩原 5 5 2 - 1 アクアマリンM306号
 【氏名】 時光 善温
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町 2 5 5 6 - 4 - 3 - 1 0 3
 【氏名】 近藤 佐千子
【特許出願人】
 【識別番号】 000236920
 【氏名又は名称】 富山県
【特許出願人】
 【識別番号】 502413278
 【氏名又は名称】 村口 篤
【特許出願人】
 【識別番号】 502413289
 【氏名又は名称】 岸 裕幸
【特許出願人】
 【住所又は居所】 富山県富山市萩原 5 5 2 - 1 アクアマリンM306号
 【氏名又は名称】 時光 善温
【特許出願人】
 【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町 2 5 5 6 - 4 - 3 - 1 0 3
 【氏名又は名称】 近藤 佐千子
【代理人】
 【識別番号】 110000109
 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス
 【代表者】 今村 正純
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 170347
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

基板の一方の主表面に複数個のマイクロウェルを有し、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップであって、マイクロウェルの開口と同一の基板表面上にマイクロウェルのマーカを有するマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 2】

複数個のマイクロウェルは同一間隔で縦横に配置されており、所定個数のマイクロウェル毎にマーカが設けられている請求項 1 に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 3】

複数個のマイクロウェルは、所定個数のマイクロウェル毎にグループ分けして基板の主表面上に設けられ、各グループの位置が把握できるようにマーカが設けられている請求項 1 または 2 に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 4】

1つのグループに属するマイクロウェルの数が10～10000の範囲である請求項 3 に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 5】

マーカが蛍光材料または反射材料からなる請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 6】

マーカが位置決めのためのマーカである請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 7】

基板はシリコン、金属または樹脂製である請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 8】

前記マイクロウェルは、円筒形、複数の面により構成される多面体、逆円錐形、若しくは逆角錐形またはこれらの2つ以上を組合せた形状である、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 9】

マイクロウェルの平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の1～2倍の範囲であり、かつマイクロウェルの深さは、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の1～4倍の範囲である、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 10】

生体細胞がリンパ球であり、抗原特異的リンパ球を1個単位で検出するために用いられるマイクロウェルアレイチップである請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【書類名】明細書

【発明の名称】マイクロウェルアレイチップ

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原特異的リンパ球などの生体細胞の検出などに用いることができるマイクロウェルアレイチップに関する。特に、本発明のマイクロウェルアレイチップは、マイクロウェルの位置決めが容易に行えるマイクロウェルアレイチップに関する。

【背景技術】

【0002】

従来、抗原特異的リンパ球は、例えば、96穴プレートを用いて、1穴あたり約200,000個のリンパ球を加えて3日から1週間、抗原の存在下で培養することにより検出していた（非特許文献1及び2）。この方法では、約200,000個と言うリンパ球集団の中に抗原特異的リンパ球が存在することは確認できた。しかし、リンパ球集団中に存在する個々の抗原特異的リンパ球を同定することはできなかった。

【0003】

これに対して近年、蛍光色素で標識した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせることにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に蛍光標識抗原を結合させ、蛍光標識抗原を結合したリンパ球を、フローサイトメータを用いることにより検出する方法が開発され利用されている（非特許文献3）。この方法では抗原に結合する1個のリンパ球を同定することが可能である。さらに抗原に結合する1個のリンパ球を分取することも可能である。

【0004】

しかしながら、上記検出方法では、分取するためにはセルソーターという高価で複雑な機器が必要である上に、以下の問題も有る。

- (1) 分取するための機器の条件設定が難しく、細胞を分取するためには機器操作の熟練を要する。
- (2) バックグラウンドが高いため抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合は抗原特異的リンパ球を検出できない。
- (3) 細胞を分取する効率は低い。
- (4) 頻度の低い細胞を分取するのに時間がかかる。
- (5) 抗原が結合することは確認できるが、抗原が結合したリンパ球の反応を解析することは難しい。

【0005】

別の抗原特異的リンパ球検出法として、磁気ビーズに結合した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせることにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に磁気ビーズ結合抗原を結合させ、磁石を用いて抗原特異的リンパ球を分取する方法も開発されている（非特許文献4）。

この方法では、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認できる。しかし、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応（細胞内シグナル伝達、RNA合成、タンパク質合成などの細胞の代謝生理反応）するかを解析することはできなかった。また、抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合は抗原特異的リンパ球を検出できなかった。

【非特許文献1】「リンパ球機能検索法」矢野純一、藤原道夫編著、中外医学社（1994年）

【非特許文献2】「免疫実験操作法I、II」右田俊介、紺田進、本庶佑、濱岡利之編集、南江堂（1995年）

【非特許文献3】Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 274:94-96, 1996

【非特許文献4】Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H, CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic sorter (MACS) can be

induced to proliferation and antibody secretion in vitro. Journal of Immunological Methods 125:19-28, 1989.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

それに対して、本発明者らは、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認でき、頻度の低い抗原特異的リンパ球(0.001%以上)も検出でき、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応するかを解析することができ、しかも抗原特異的リンパ球を分取できる抗原特異的リンパ球検出法を提供することを種々検討してきた。そして、1つ1つのリンパ球の抗原特異性を個別に検出し、さらに検出された抗原特異的リンパ球を回収する方法について開発を進めてきた。

しかし、従来は、1つ1つのリンパ球の抗原特異性を個別に検出し、さらに検出された抗原特異的リンパ球を回収することができるマイクロウェルアレイチップは知られていなかった。

【0007】

そこで本発明者らは、上記検出法に利用可能な、1つのリンパ球を1つのマイクロウェルに収納可能なマイクロウェルアレイチップを提供すべく種々の検討を重ねてきた。そして、基板表面に1つのリンパ球を収納できる程度の大きさのマイクロウェルを形成したマイクロウェルアレイチップを試作し、リンパ球のマイクロウェルへの格納(捕集)、及びマイクロウェルからの回収テストを行ってきた。その過程で、微細なマイクロウェルが多数設けられたアレイチップ上において検出された抗原特異的リンパ球を回収する場合、特に、検出と回収を別の工程で行う場合、検出したマイクロウェルから確実に間違いなく抗原特異的リンパ球を回収するためには、マイクロウェルの位置決めを確実に行う必要があることが判明した。即ち、単に多数のマイクロウェルを配列しただけのアレイチップでは、特定のマイクロウェルの位置決めが容易でないという問題があった。

【0008】

そこで本発明の目的は、上記検出法に利用可能な、1つのリンパ球を1つのマイクロウェルに収納可能なマイクロウェルアレイチップを提供することにある。特に本発明は、多数の、かつ微細なマイクロウェルの位置を容易に決定できるマイクロウェルアレイチップを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するための発明は以下の通りである。

【請求項1】基板の一方の主表面に複数個のマイクロウェルを有し、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップであって、マイクロウェルの開口と同一の基板表面上にマイクロウェルのマーカーを有するマイクロウェルアレイチップ。

【請求項2】複数個のマイクロウェルは同一間隔で縦横に配置されており、所定個数のマイクロウェル毎にマーカーが設けられている請求項1に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項3】複数個のマイクロウェルは、所定個数のマイクロウェル毎にグループ分けして基板の主表面上に設けられ、各グループの位置が把握できるようにマーカーが設けられている請求項1または2に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項4】1つのグループに属するマイクロウェルの数が10～10000の範囲である請求項3に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項5】マーカーが蛍光材料または反射材料からなる請求項1～4のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項6】マーカーが位置決めのためのマーカーである請求項1～5のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項7】基板はシリコン、金属または樹脂製である請求項1～6のいずれか1項に記載

のマイクロウェルアレイチップ。

[請求項 8] 前記マイクロウェルは、円筒形、複数の面により構成される多面体、逆円錐形、若しくは逆角錐形またはこれらの 2 つ以上を組合せた形状である、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

[請求項 9] マイクロウェルの平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の 1～2 倍の範囲であり、かつマイクロウェルの深さは、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の 1～4 倍の範囲である、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

[請求項 10] 生体細胞がリンパ球であり、抗原特異的リンパ球を 1 個単位で検出するために用いられるマイクロウェルアレイチップである請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【発明の効果】

【0010】

本発明のマイクロウェルアレイチップは、目標となる位置に蛍光物質または反射構造体などのマーカーを有し、このマーカーは位置決めのためのマーカーとして機能し、これにより蛍光顕微鏡などによる位置認識を補助することができる。本発明のマイクロウェルアレイチップでは、例えば、蛍光顕微鏡やイメージスキャナーなどによりマイクロウェルの位置を容易に決定でき、その結果、各マイクロウェルに格納された特定の 1 個の被検体生体細胞、例えば、抗原特異的リンパ球を特定することが容易にできるようになる。

【0011】

その結果、例えば、検出された抗原特異的リンパ球を取り出して、抗原特異的抗体遺伝子や T 細胞受容体遺伝子をクローニングすることも可能になる。例えば、抗原特異的抗体遺伝子がクローニングできると、それを用いて大量にヒト型モノクローナル抗体を生産することができる。この抗体を感染症などの患者へ投与することにより、感染症などの治療、予防に用いることができると考えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

【マイクロウェルアレイチップ】

本発明のマイクロウェルアレイチップは、基板の一方の主表面に複数のマイクロウェルを有し、前記マイクロウェルは、1 つのマイクロウェルに 1 つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有する。さらに本発明のマイクロウェルアレイチップは、マイクロウェルの開口と同一の基板表面上にマイクロウェルのマーカーを有する。

上記被検体生体細胞は、例えば、リンパ球であることができ、本発明のマイクロウェルアレイチップは、例えば、抗原特異的リンパ球を 1 個単位で検出するために用いることができる。

【0013】

本発明のマイクロウェルアレイチップでは、複数のマイクロウェルは同一間隔で縦横に配置されており、所定個数のマイクロウェル毎にマーカーが設けられていることが好ましい。特に、本発明のマイクロウェルアレイチップでは、所定個数のマイクロウェル毎にグループ分けして基板の主表面上に設けられ、各グループの位置が把握できるようにマーカーが設けられている。

【0014】

例えば、図 1 に、 10×10 のマイクロウェル 1b のグループ 1c を縦横 3 個ずつ設けたマイクロウェルアレイチップ 1a の平面図を示す。そして、各 10×10 のマイクロウェルのグループ 1c の四隅にマーカー 1d が設けられている。尚、マイクロウェルアレイチップ 1a 全体の四隅に設けられるマーカーは、各グループの四隅に設けられたマーカーとは識別できるマーカーが設けられることもできる。

1 つのマイクロウェルのグループを構成するマイクロウェルの数には特に制限はないが、例えば、 $10 \sim 10000$ の範囲であることができる。

また、マーカーは、単に位置を知らしめるための物であっても良いが、数字や文字であ

ってもよい。数字や文字のマーカを用いることで各グループの位置を決めるだけでなく、各グループを特定することもできる。即ち、各グループに番地を付与することもできる。

【0015】

マーカは、例えば、蛍光顕微鏡やイメージスキャナで読み取りすることができ、そのため、蛍光材料または反射材料からなることが好ましい。

蛍光材料としては、具体的には、外部より入射した励起光に対して特定の波長の蛍光発光を有する材料で、好ましくは、薄膜化が可能で半導体集積回路制作技術の一つであるフォトリソグラフィにより加工が可能な材料を選択する。例えば、 α -ナフトキノンジアジト- β -ボラック型レジスト、例えば、東京応化工業（株）OFPR-800などが好ましい。

【0016】

また、反射材料としては、加工された基板材料、また、基板上に作製された薄膜などが選択される。基板材料をエッチングや押し込み加工などによって加工することで、例えば、表面に対して傾斜を持った反射構造を作製したり、また、文字や情報などを有する認識パターンなどを形成することが可能である。また、基板材料上に薄膜を形成し、エッチングなどの加工により凹凸構造を作製することで、薄膜表面の微細な凹凸、薄膜端面の傾斜によって乱反射構造が形成され、上記と同様の効果が可能である。

【0017】

マイクロウェル内にある試料を、蛍光を利用して観察する際、蛍光を発していない部分は全く見えない。そのため、試料の基板上での位置を把握するためには、蛍光による標識が必要となってくる。

【0018】

マイクロウェルの形状や寸法には特に制限はないが、マイクロウェルの形状は、例えば、円筒形であることができ、円筒形以外に、複数の面により構成される多面体（例えば、直方体、六角柱、八角柱等）、逆円錐形、逆角錐形（逆三角錐形、逆四角錐形、逆五角錐形、逆六角錐形、七角以上の逆多角錐形）等であることもでき、これらの形状の二つ以上を組み合わせた形状であることもできる。例えば、一部が円筒形であり、残りが逆円錐形であることができる。また、逆円錐形、逆角錐形の場合、底面がマイクロウェルの開口となるが、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状である（その場合、マイクロウェルの底部は平坦になる）こともできる。円筒形、直方体は、マイクロウェルの底部は通常、平坦であるが、曲面（凸面や凹面）とすることもできる。マイクロウェルの底部を曲面とすることができるのは、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状の場合も同様である。

【0019】

マイクロウェルの形状や寸法は、マイクロウェルに格納されるべき生体細胞の種類（生体細胞の形状や寸法等）を考慮して、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞が格納されるように、適宜決定される。

1つのマイクロウェルに1つの生体細胞が格納されるようにするためには、例えば、マイクロウェルの平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の1~2倍の範囲、好ましくは1.1~1.9倍の範囲、より好ましくは1.2~1.8倍の範囲であることが適当である。

また、マイクロウェルの深さは、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の1~4倍の範囲、好ましくは1.1~1.9倍の範囲、より好ましくは1.2~1.8倍の範囲であることが適当である。

【0020】

マイクロウェルが円筒形の場合、その寸法は、例えば、直径5~100 μ mであることができ、生体細胞がBリンパ球の場合、好ましくは、直径は5~15 μ mである。また、深さは、例えば、5~100 μ mであることができ、生体細胞がBリンパ球の場合、好ましくは、深さは5~40 μ mであることができる。但し、マイクロウェルの寸法は、上述のように、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径とのマイクロウェルの寸法の好適な比を

考慮して適宜決定する。

【0021】

1つのマイクロウェルアレイチップが有するマイクロウェルの数は、特に制限はないが、生体細胞がリンパ球の場合、抗原特異的リンパ球の頻度が 10^5 個に1個から多い場合には約500個であるという観点から、 1cm^2 当たり、例えば、2,000～1,000,000個の範囲であることができる。

【0022】

本発明のマイクロウェルアレイチップは、例えば、シリコン、金属、または樹脂製であることができる。但し、シリコン製であることで、現在半導体集積回路作製技術の主流であるシリコン加工技術をそのまま応用することが可能であり、特に微細加工性、大量量産性、将来のセンサーを含めた分析回路との集積化という意味で他の材料より優れている。上記金属としては、例えば、アルミニウム、ステンレス、銅、ニッケル、クロム、チタン等を挙げることができる。

上記樹脂としては、例えば、ポリイミド、ポリエチレン、塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリカーボネート、アクリル、ポリエチレンテレフタレート等を挙げることができる。

【0023】

マイクロウェルアレイチップが、例えば、シリコン製であり、マーカーが蛍光材料からなる場合についてその製造方法を説明する。

(1) 蛍光物質（たとえば、東京応化OFPR-800）をシリコン基板の一方の主表面に塗布する。蛍光物質は、東京応化OFPR-800以外の材料であっても、励起光を吸収し、それによって励起状態から基底状態に戻る際に蛍光としてエネルギーを放出する特性をもつ物質であれば、適宜選択することができ、好ましくは、フォトリソグラフィによる加工が可能であることが望ましい。例えば、クラリアント社AZP1350などでも代用できる。

(2) この表面にフォトリソグラフィにて標識パターンを形成し、蛍光物質の耐溶剤性を向上させるために高温（たとえば 180°C ）でハードニング処理をおこなう。ハードニング処理の温度は、蛍光物質に応じて適宜選択できる。

(3) ハードニング処理後、フォトリソグラフィによってマイクロウェルパターンを形成し、低温（ 100°C 以下）でハードニングをおこなう。マイクロウェルパターンは、マイクロウェルの寸法や配列等に応じて適宜決定できる。また、ハードニング温度は、マイクロウェルパターンに使用するフォトレジスト材料に応じて適宜決定できる。

(4) ドライエッチング法などにより、ウェルを形成する。ウェル形成のためのドライエッチング法は、公知の方法を適宜使用できる。

(5) アセトンなどの有機溶剤にてウェルパターンマスクに用いたフォトレジストを取り除く。使用する有機溶剤はアセトンに限られない。フォトレジストを取り除くことができる物であれば、適宜使用できる。

フォトレジストを取り除くことにより、シリコン基板に形成されたマイクロウェルと蛍光標識のみがチップ上に残され、本発明のマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0024】

次に、マイクロウェルアレイチップが、例えば、シリコン製であり、マーカーが反射性材料からなる場合についてその製造方法を説明する。

(1) フォトリソグラフィにより、シリコン基板の一方の主表面に標識パターンを形成する。また、薄膜などによって反射構造を作製する場合は、フォトリソグラフィの前に予め薄膜材料を同表面に形成する必要がある。

(2) エッチング、例えば面方位異方性エッチング特性を有するアルカリ溶液に浸し、例えば、逆ピラミッド状の反射構造を作製する。薄膜の場合にはエッチング方法を適宜選択する。

(3) フォトリソグラフィによってマイクロウェルパターンを形成する。マイクロウェルパターンは、マイクロウェルの寸法や配列等に応じて適宜決定できる。

(4) ドライエッチング法などにより、ウェルを形成する。ウェル形成の為のドライエッチング法は、公知の方法を適宜仕様できる。

(5) フォトリソグスト剝離液などを用いて、フォトリソグストを取り除く。

【0025】

フォトリソグストを取り除くことにより、シリコン基板上に形成されたマイクロウェルと反射性標識のみがチップ上に残され、本発明によるマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0026】

マーカ-の使用方方法

蛍光検出器において使用される励起光を、反射構造や凹凸形状表面で乱反射させる。検出器には通常目的とする蛍光波長以外を取り除くバンドパスフィルターが取り付けられている為、チップ表面で全反射した励起光は検出器には入射しない。しかし、乱反射した光は、初段のバンドパスフィルター的な性能を持つミラーを反射して検出器まで到達することが可能になる。そこで、後段にある検出器前のバンドパスフィルターを標識認識の際に取り外すことで乱反射光が検出器までに入射する。標識パターン形状は、凸よりも凹形状のものが認識性に優れる。

【0027】

実施例1

(蛍光マーカ-)

図1は本発明に係るデバイスの実施形態例である。

図1は、シリコン材料などの基板上面1aに多数のマイクロウェル1bが形成されたマイクロウェルアレイチップである。マイクロウェル1bは、位置認識を容易にするために適当な数(たとえば10×10:100ヶ)単位でクラスター1cを形成している。本マイクロウェルアレイチップの用途の一つとして、各ウェルに蛍光体を付加した評価対象物を導入、その蛍光発光の確認がある。この際、蛍光顕微鏡、蛍光スキャナ-などによる観察は蛍光波長に準じた仕様で行われるため、蛍光発光しないものは観察することができない。そこで、図1に示すように各クラスター間に蛍光物質による微小なマーカ-1dが形成されている。

【0028】

本マーカ-の作製方方法は以下の通り(図2)である。

例として、シリコン材料などの基板に形成されるマイクロウェルについてその作製方方法をまとめる。

(1)酸化シリコン膜2aのついたシリコン基板2b(図2(A))に例えば東京応化工業(株)ノボラック樹脂系ポジ型フォトリソグストOFPR-800を塗布し、マーカ-パターン2cを基板上に形成する(図2(B))。

(2)熱架橋などによるフォトリソグストの耐薬品性向上の為に、180℃で30分間、基板をハードニングするなどの処理をおこなう。

(3)もう一度、フォトリソグスト2dを塗布してマイクロウェルを作製するために必要な開口パターン2eをシリコン基板2b上に形成する(図2(C)及び(D))。このとき、現像後のハードニングは100~110℃程度の低温でおこなう。

(4)フッ酸で開口部の酸化シリコン膜2aを取り除き、シリコンを露出させる。

(5)ドライエッチング法などによってシリコン基板2bをエッチングし、マイクロウェル2fを作製する(図2(E))。

(6)(3)で塗布したフォトリソグスト2dをメタノール、アセトン等に取り除き、本発明のマイクロウェルアレイチップを得た(図2(F))。

【0029】

以上の工程によって図2の様な形状が容易に作製可能である。マーカ-2cのパターンはデザイン、記号、文字等自由に選択することが可能である。また、マーカ-以外にマイクロチップ上に情報等を表示することも可能である。

【0030】

実施例2

(反射マーカ-)

図3はシリコン基板3a上に凹凸を形成してその散乱光を上記同様蛍光顕微鏡、蛍光スキャナーによって観察可能にする反射マーカー3dの実施形態である。シリコン基板3a上に多数配列されたマイクロウェル3bのクラスターの位置認識等のマーカー等に使用される。基板上にエッチングなどによって凹み3eを作製することで、蛍光励起光を凹みで乱反射させ観察装置へ導入することでその凹み位置を認識できるようにするものである。

【0031】

図4にその原理を示す。図左側の様な凹凸等、何も無い基板4a表面に当たった場合は、全面反射により観察装置への励起光の入射はない。しかし、右側のように凹み4bにより、励起光を放射状に散乱させると観察装置の光学系に反射光が入射し認識できるようになる。

励起光を放射状に散乱させるという観点からは、凹み4bの底部は、逆ピラミッド状であることが好ましい。

【0032】

反射マーカーを有するマイクロウェルアレイチップの製造例を、基板をシリコンとした場合について、図5及び6に基づいて説明する。

(1)酸化シリコン膜5aのついたシリコン基板5b(図5(A))に例えば東京応化工業(株)ノボラック樹脂系ポジ型フォトレジストOFPR-800(5c)を塗布し、マーカーパターン5dを基板上に形成する(図5(B))。

(2)フッ酸によってフォトレジスト5cから開口している酸化シリコン膜5aを取りのぞき、シリコンを露出させる(図5(C))。

(3)フォトレジスト5cを取り除き、シリコン基板5bを水酸化テトラメチルアンモニウムや水酸化カリウムなどのアルカリエッチャントに浸漬して異方性エッチングをおこない、凹み構造5eを作製する(図5(D))。この時点で本発明によるマーカーは完成する。この後、マイクロウェルアレイ構造を作製する。

(4)ここで必要な場合は、酸化シリコン膜や窒化シリコン膜等のマスク薄膜を再度基板5b表面に追加形成する(図6(A))。

(5)再びフォトレジスト5fを塗布して(図6(B))、マイクロウェルパターン5gを形成し、開口部の酸化シリコン膜あるいは窒化シリコン膜等をエッチャントで取り除きシリコンを露出させる(図6(C))。

(6)必要に応じてフォトレジスト5fを取り除き、ドライエッチング、ウエットエッチングによってマイクロウェル5hを作製する(図6(D))。

(7)必要があれば、フォトレジスト5fを取り除き、本発明のマイクロウェルアレイチップを得た(図6(E))。

【産業上の利用可能性】

【0033】

本発明のマイクロウェルアレイチップでは、各マイクロウェルに格納された特定の1個の被検体生体細胞、例えば、抗原特異的リンパ球を特定することが容易にできるようになる。さらに、本発明のマイクロウェルアレイチップを用いることで、血中細胞の分別を行うこともできる。即ち、マイクロウェル径を所定の値に設定することで、血中細胞をマイクロウェル径を超えるものと下回るものに分別することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】10×10のマイクロウェル1bのグループ1cを縦横3個ずつ設けたマイクロウェルアレイチップ1aの平面図を示す。

【図2】実施例1における蛍光マーカーを有する本発明のマイクロウェルアレイチップの作製方法の説明図。

【図3】シリコン基板3a上に反射マーカー3dを有するマイクロウェルアレイチップ3aの平面図を示す。

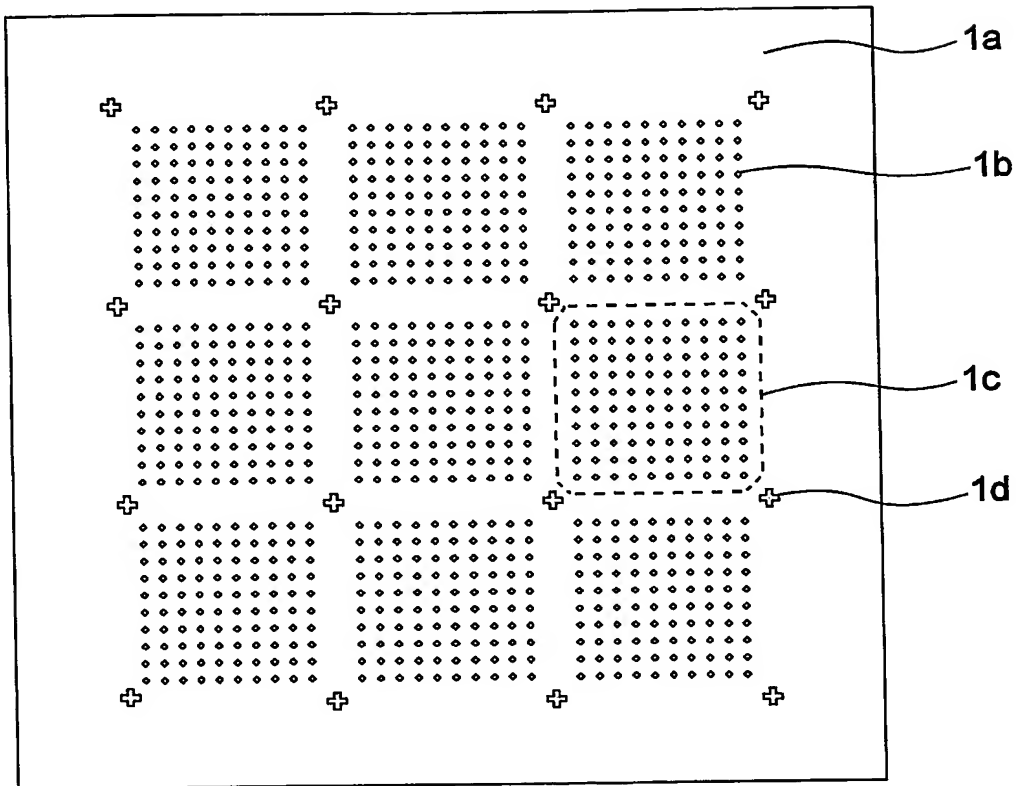
【図4】反射マーカーの反射原理の説明図。

【図5】実施例2における反射マーカーを有する本発明のマイクロウェルアレイチッ

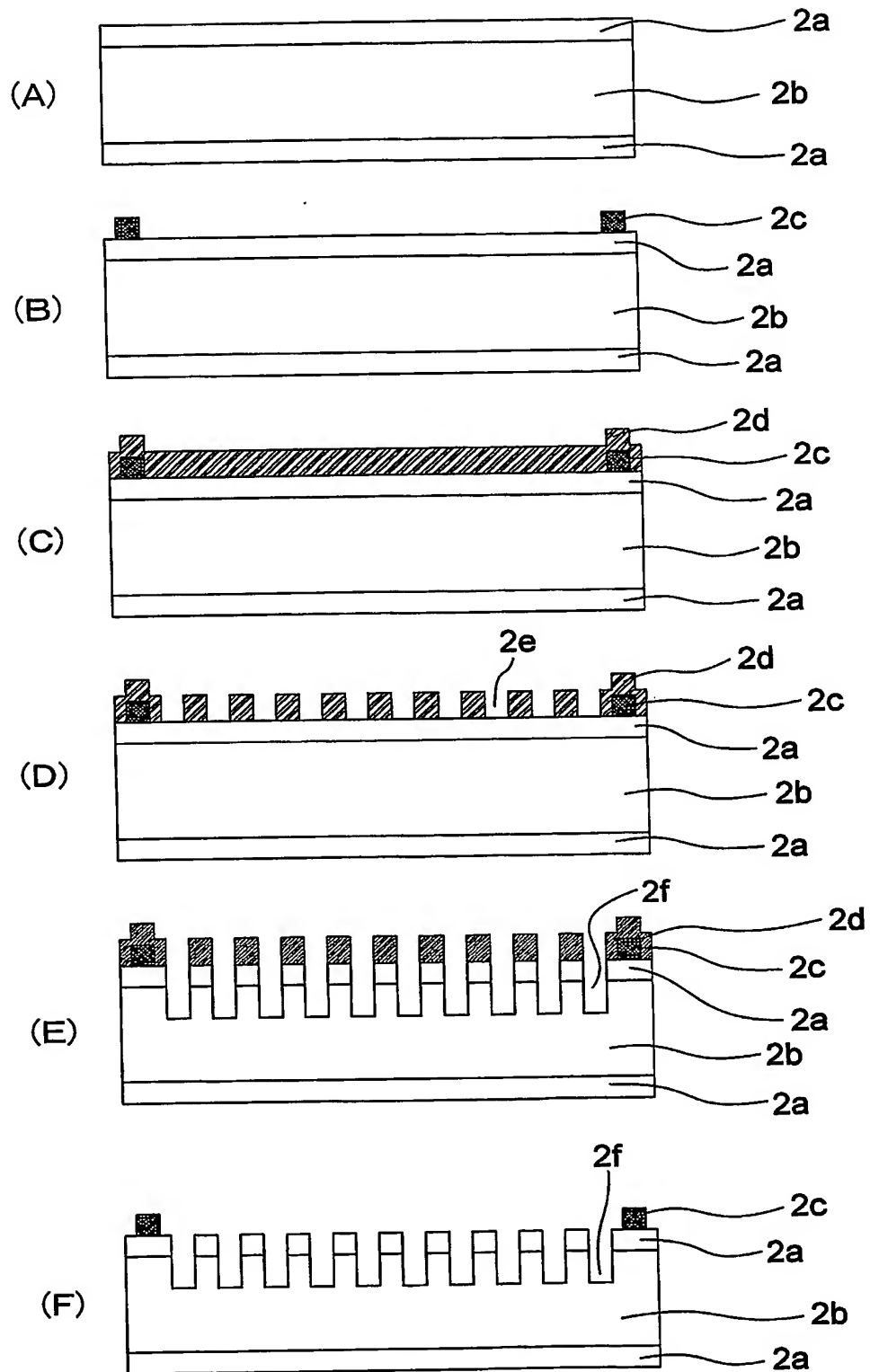
プの作製方法（前半）の説明図。

【図 6】 実施例 2 における反射マーカを有する本発明のマイクロウェルアレイチップの作製方法（後半）の説明図。

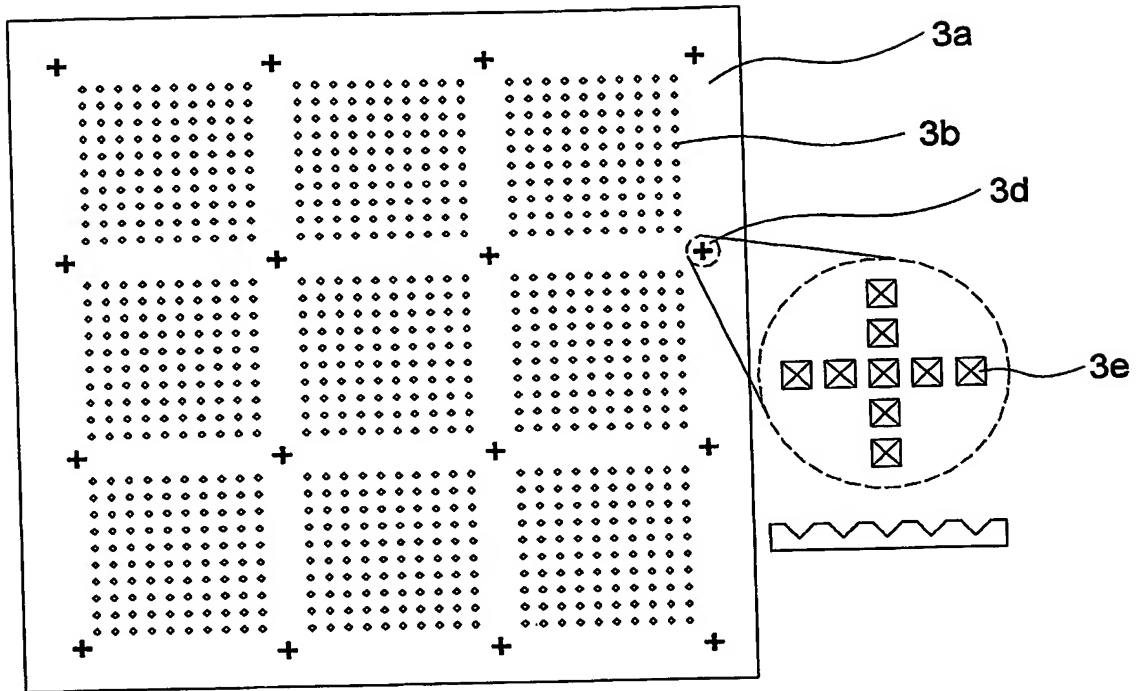
【書類名】 図面
【図 1】



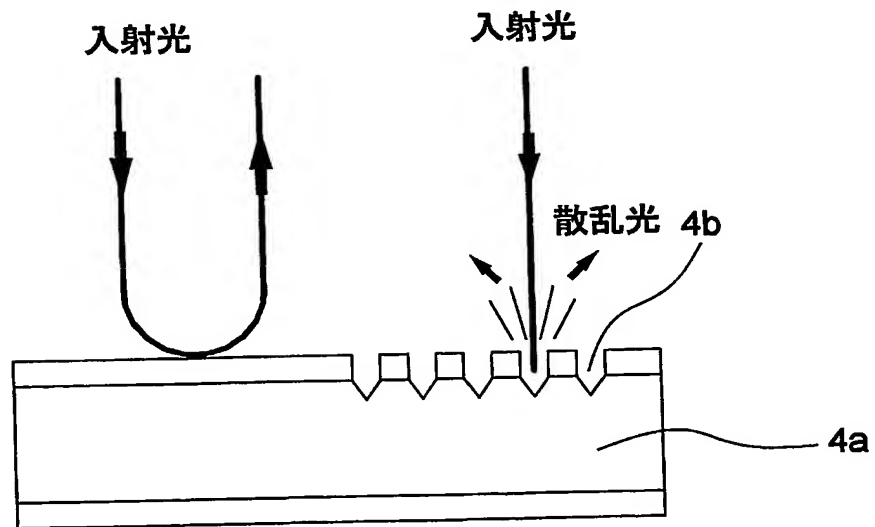
【図 2】



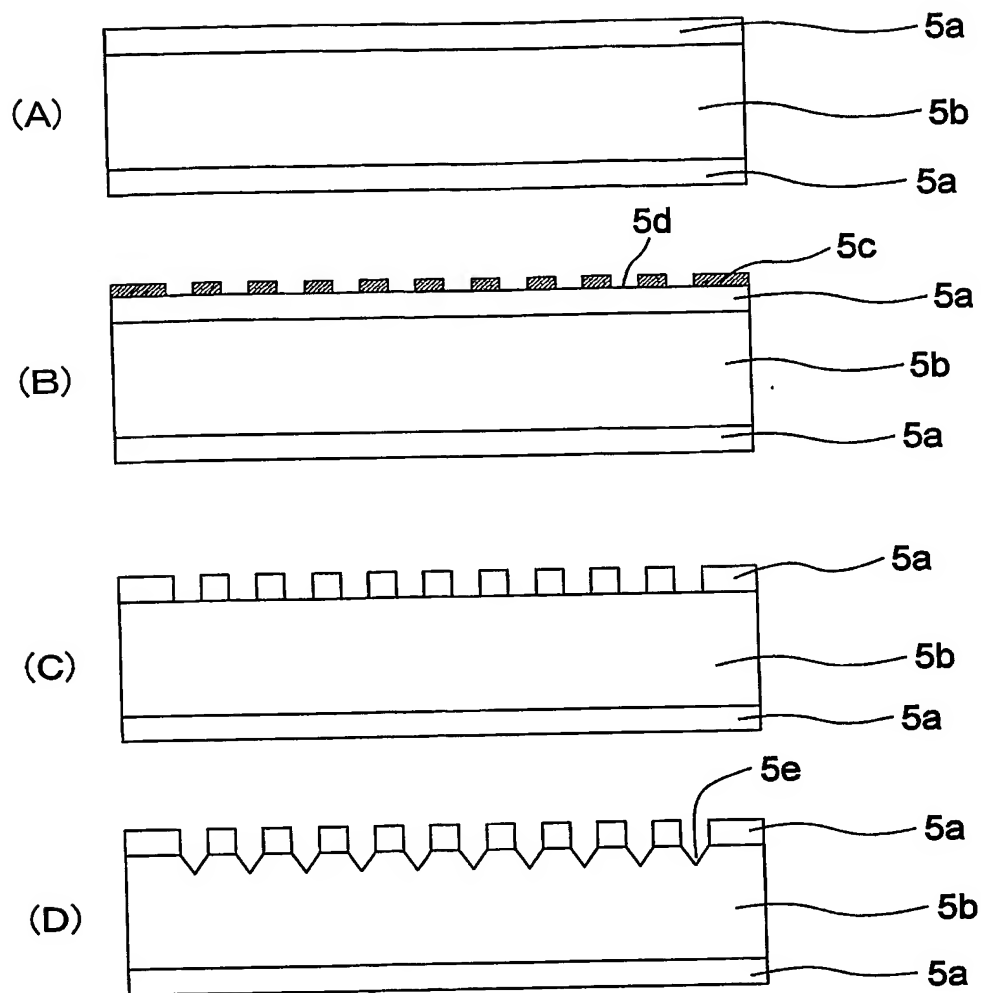
【図 3】



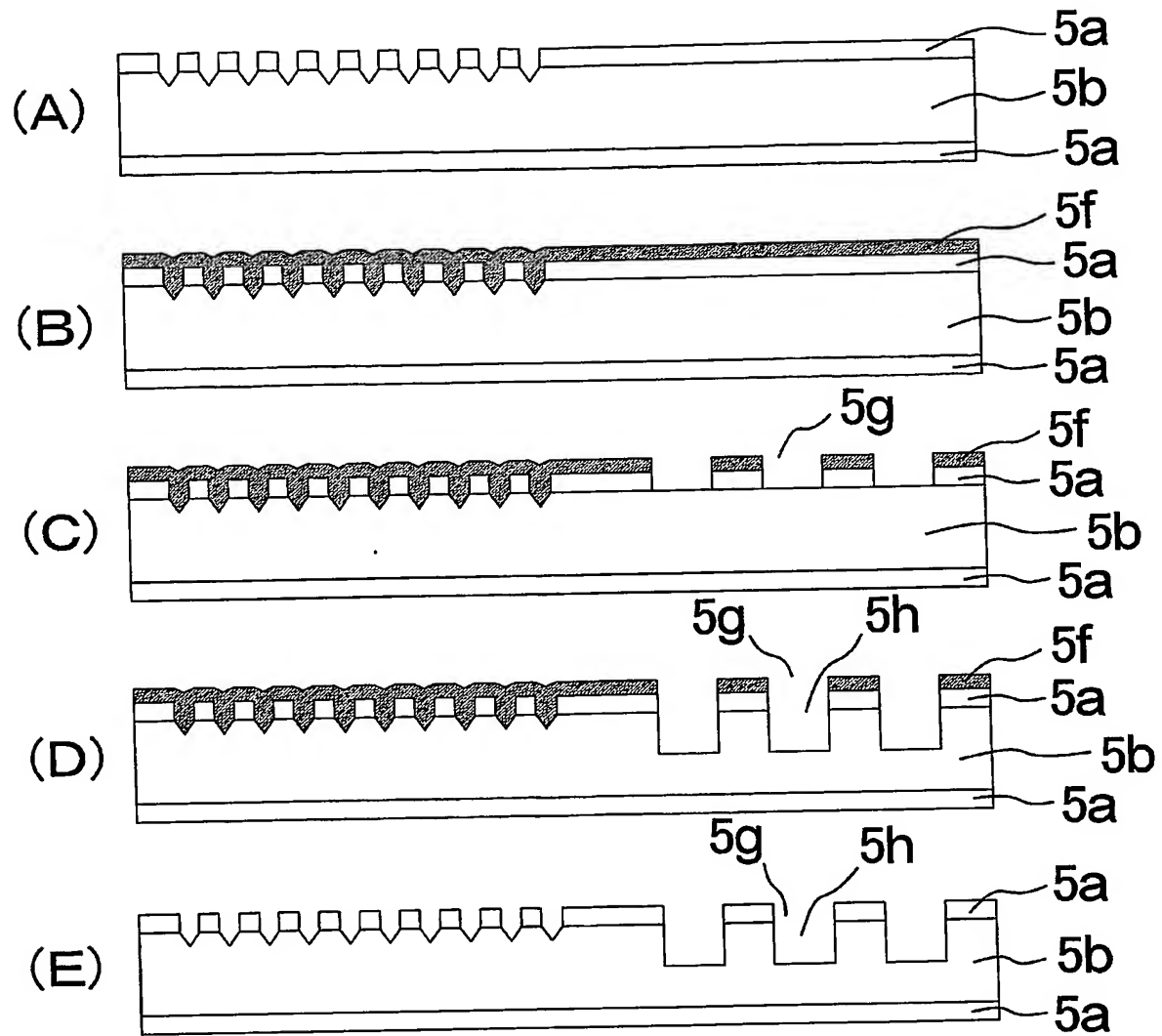
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】要約書**【要約】**

【課題】 1つのリンパ球を1つのマイクロウェルに収納可能なマイクロウェルアレイチップを提供すること。特に、多数の、かつ微細なマイクロウェルの位置を容易に決定できるマイクロウェルアレイチップを提供すること。

【解決手段】 基板の一方の主表面に複数個のマイクロウェルを有し、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップであって、マイクロウェルの開口と同一の基板表面上にマイクロウェルのマーカーを有するマイクロウェルアレイチップ。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 3 - 3 3 6 7 7 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 2 3 6 9 2 0]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市新総曲輪 1 番 7 号

氏 名

富山県

特願 2 0 0 3 - 3 3 6 7 7 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 4 1 3 2 7 8]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 1 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

富山県富山市明輪町 1 - 1 0 8 - 1 3 0 1

氏 名

村口 篤

特願 2003-336771

出願人履歴情報

識別番号

[502413289]

1. 変更年月日

2002年11月14日

[変更理由]

新規登録

住所

富山県富山市五福末広町2556-4-3-101

氏名

岸 裕幸

特願 2003-336771

出願人履歴情報

識別番号

[503349497]

1. 変更年月日

2003年 9月25日

[変更理由]

新規登録

住所

富山県富山市萩原552-1 アクアマリンM306号

氏名

時光 善温

特願 2003-336771

出願人履歴情報

識別番号

[503349501]

1. 変更年月日

2003年 9月25日

[変更理由]

新規登録

住所

富山県富山市五福末広町2556-4-3-103

氏名

近藤 佐千子

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.